



WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

INSTYTUT BIOLOGII EKSPERYMENTALNEJ
ul. Kanonia 6/8
50-328 Wrocław

tel. +48 71 375 41 18
fax +48 71 343 41 18

ibe@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

Dziekanat MWB UG i GUMed
Wpłynęło dnia 19-05-2019
L.dz. nr 1000/29/2019

Prof. dr hab. Robert Wysocki
email: robert.wysocki@uwr.edu.pl

Wrocław, 2019-04-30

Ocena osiągnięcia naukowego pt. "Deubikwitynacja jako mechanizm kontroli funkcji retikulum endoplazmatycznego oraz degradacji niewłaściwie zlokalizowanych białek", pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych, współpracy międzynarodowej, dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego dr. Pawła Leźnickiego w związku z postępowaniem habilitacyjnym wszczętym w dniu 30 stycznia 2019 r. w dziedzinie nauk biologicznych, w dyscyplinie biochemia

Ocenę przeprowadzono na podstawie dokumentacji dostarczonej z Dziekanatu Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wraz z pismem Centralnej Komisji ds. Stopni i Tytułów nr BCK-III-L-6411/2019 z dnia 1 kwietnia 2019 r. w celu przeprowadzenia postępowania habilitacyjnego dr. Pawła Leźnickiego.

Sylwetka Habilitanta

Dr Paweł Leźnicki uzyskał tytuł zawodowy licencjata biotechnologii w roku 2004, a następnie magistra biotechnologii w roku 2006, oba na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Stopień doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia uzyskał w 2010 roku na Wydziale Nauk o Życiu, University of Manchester, Wielka Brytania, na podstawie rozprawy doktorskiej pt. "The biogenesis of tail-anchored membrane proteins at the endoplasmic reticulum". Promotorem rozprawy doktorskiej był prof. Stephen High. Od czasu uzyskania stopnia doktora po dzień dzisiejszy Habilitant przebywa na stażach podoktorskich, najpierw na University of Manchester, potem University of Dundee i ponownie na University of Manchester, gdzie obecnie pracuje jako Postdoctoral Research Associate.



Ocena osiągnięcia naukowego

Jako osiągnięcie naukowe dr Paweł Leźnicki przedstawił monotematyczny cykl czterech współautorskich prac eksperymentalnych oraz jednej przeglądowej opublikowanych w renomowanych czasopismach z bazy Journal Citation Reports (JCR), tj. Journal of Cell Science (IF 5-letni 5.094), PNAS (IF 5-letni 10.359) i PLoS One (IF 5-letni 3.352) w latach 2012-2018 pod wspólnym tytułem "Deubikwitynacja jako mechanizm kontroli funkcji retikulum endoplazmatycznego oraz degradacji niewłaściwie zlokalizowanych białek". Sumaryczny impact factor wymienionych artykułów z roku publikacji wynosi 26.839, a prace były już cytowane w sumie 84 razy. Analiza oświadczeń współautorów oraz samego Habilitanta pozwala mi wyrazić opinię, że dr Paweł Leźnicki pełnił rolę wiodącą w powstaniu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego. Jego procentowy wkład w powstanie artykułów wynosił od 35% do 90% i we wszystkich pracach był pierwszym autorem. W dwóch pracach był drugim autorem korespondencyjnym. Habilitant m.in. brał udział w planowaniu doświadczeń, wykonał osobiście większość eksperymentów, był autorem konstrukcji plazmidowych używanych w pracach, przygotował oczyszczone preparaty białek badanych w pracach, analizował i interpretował wyniki, napisał teksty manuskryptów, przygotował ryciny oraz odpowiadał na uwagi recenzentów. Mam tylko jedną wątpliwość dotyczącą 60% wkładu w powstanie publikacji Leźnicki i wsp. (J Cell Sci, 2018), w której drugi autor jest równorzędny z pierwszym. W takim przypadku wkład Habilitanta powinien wynosić poniżej 50%, zwłaszcza, że jest jeszcze 11-stu innych współautorów tej publikacji.

W pracach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego dr Paweł Leźnicki przeprowadził badania nad mechanizmami kontroli jakości białek błonowych typu "tail-anchored" (TA) i sekrecyjnych kierowanych post-translacyjnie do retikulum endoplazmatycznego (ER). Wiadomo było już wcześniej, że u ssaków kompleks BAG6, który wraz z białkiem SGTA dostarcza białka typu TA do receptora TRC40, bierze także pośrednio udział w ubikwitynacji i kierowaniu do degradacji białek typu TA, które nie zostały zlokalizowane w ER. Słuszne było zatem zbadanie czy białko SGTA pełni w komórce podobne funkcje co białko BAG6. W pierwszej chronologicznie pracy z cyklu Leźnicki i High, 2012, PNAS), posługując się bardzo dobrze dobranymi metodami biochemicznymi, Habilitant odkrył, że odwrotnie niż BAG6 białko SGTA stabilizuje białka typu TA zlokalizowane poza ER poprzez promowanie ich deubikwitynacji. Przy czym udowodniono, że białko SGTA nie ma aktywności deubikwitynazy, ale prawdopodobnie może kierować odpowiednie enzymy deubikwitynujące do źle zlokalizowanych ubikwitynowanych białek TA. Co ważne wyniki uzyskane *in vitro* potwierdzono badaniami *in vivo*. W pracy tej zaproponowano elegancki model, w którym SGTA działa antagonistycznie z BAG6 uniemożliwiając przedwczesną degradację białek typu TA. Badanie te były kontynuowane, co zaowocowało kolejną publikacją Wunderley'a i wsp.

(2014, J Cell Sci), w której postuluje się, że SGTA przyłącza źle zlokalizowane/sfałdowane białka i chroni je przed ubikwitynacją i degradacją, co jest promowane przez kompleks BAG6; w konsekwencji aktywność SGTA daje czas na korektę fałdowania źle zlokalizowanego białka TA i ponowną próbę skierowania go do ER. Mimo mniejszego wkładu Habilitanta w powstanie tej publikacji, bardzo szkoda, że Habilitant nie włączył jej do osiągnięcia habilitacyjnego.

Biorąc pod uwagę antagonistyczne funkcje BAG6 i SGTA oraz znane fizyczne interakcje między SGTA a kompleksem BAG6 złożonym z białek BAG6, TRC35 i UBL4A, w drugiej pracy z cyklu (Leźnicki i wsp., 2013, PLoS One) zmapowano miejsca interakcji SGTA z kompleksem BAG5. Wykazano, że SGTA wiąże się albo do N-końcowej domeny przypominającej ubikwitynę w białku BAG6 albo do podobnej domeny białka UBL4A, ale nigdy jednocześnie do obu białek kompleksu BAG6. N-końcowa domena BAG6 jest także miejscem wiązania enzymów E2 i E3 szlaku ubikwityny, co sugeruje, że SGTA może konkurować z nimi o miejsce wiązania w białku BAG6 i w ten sposób osłabiać promowanie ubikwitynacji białek TA przez BAG6. W pracy tej wykazano ponadto, że środkowy region białka BAG6 jest odpowiedzialny za wiązanie hydrofobowych substratów białkowych.

Kontynuując badania nad mechanizmem działania SGTA w ochronie białek przed degradacją, w kolejnej publikacji dr Leźnicki wraz z współpracownikami (2015, J Cell Sci) wykazał, że środkowa domena TPR białka SGTA wchodzi w bezpośrednie fizyczne interakcje z białkiem Rpn13, składnikiem podjednostki 19S proteasomu, poprzez C-końcowy region Rpn13, a więc poza regionami odpowiedzialnymi za wiązanie ubikwityny i proteasomu. Ponadto uzyskano dane sugerujące, że SGTA wiąże się do proteasomu, aby stymulować deubikwitynację i stabilizację źle zlokalizowanych białek, na etapie ich wychwycenia przez proteasom, tuż przed degradacją.

W czwartej pracy z cyklu (Leźnicki i Kulathu, 2017, J Cell Sci) usystematyzowano wiedzę na temat funkcji i regulacji aktywności enzymów deubikwitynujących, które są stosunkowo słabo poznane w porównaniu z siatką enzymów E2 i E3 szlaku ubikwitynacji. Na podstawie dostępnej literatury, Autorzy zaproponowali co najmniej cztery mechanizmy regulujące aktywność enzymów deubikwitynujących i ich dostępność wobec substratów, tj. interakcje z innymi partnerami białkowymi, modyfikacje post-translacyjne, w tym proteoliza, lokalizacja subkomórkowa oraz ekspresja alternatywnych izoform enzymów deubikwitynujących.

Idąc tym tropem w ostatniej chronologicznie pracy z cyklu habilitacyjnego (Leźnicki i wsp., 2018, J Cell Sci) przedstawiono analizę funkcjonalną ludzkiej deubikwitynazy USP35 o słabo poznanej funkcji i regulacji. W pracy tej wykazano, że USP35 występuje w dwóch izoformach o odmiennej lokalizacji i funkcji. Dłuższa forma USP35^{iso1} występuje głównie w cytosolu, a jego nadekspresja hamuje apoptozę

aktywowaną przez szlak zewnętrzny, co sugeruje antyapoptotyczną rolę tej izoformy. Co ciekawe, krótsza izoforma USP35^{iso2} lokalizuje się w błonie ER oraz w kroplach lipidowych, a jej nadekspresja wywołuje stres w ER, prawdopodobnie poprzez zaburzenia syntezy cholesterolu oraz promuje apoptozę. Warto podkreślić, że USP35^{iso2} jest dopiero drugim zidentyfikowanym enzymem deubikwitynującym zlokalizowanym w błonie ER i pierwszym w kroplach lipidowych.

W Autoreferacie zabrakło mi bardziej szczegółowych planów badawczych Habilitanta czy nowych pytań, które narodziły się podczas Jego badań prezentowanych jako osiągnięcie habilitacyjne. Szkoda też, że nie wyjaśniono wszystkich stosowanych skrótów czy nazw, np. APP, i że nie podano nazw odpowiedników drożdżowych białek badanych przez Habilitanta, zwłaszcza że model drożdżowy był również wykorzystywany w badaniach Habilitanta. Warto byłoby też zaznaczyć w tekście Autoreferatu, że alternatywną nazwą białka BAG6 jest Bat3, używaną wcześniej także przez Habilitanta (patrz Leźnicki i wsp., 2010, J Cell Sci).

Podsumowując, uzyskane przez Habilitanta wyniki są oryginalne, na wysokim poziomie merytorycznym, poszerzyły wiedzę na temat funkcji enzymów usuwających ubikwitynę z białek oraz systemów kontroli jakości białek, stanowią znaczny wkład w rozwój badań nad biogenezą białek typu TA oraz proteostazą komórek eukariotycznych, co w przyszłości może się także przyczynić do poznania przyczyn chorób człowieka spowodowane zaburzeniami lokalizacji czy kontroli jakości białek oraz opracowania nowych terapii tych chorób. W związku z tym z pełnym przekonaniem stwierdzam, że osiągnięcie naukowe dr. Pawła Leźnickiego spełnia wymogi zawarte w art. 16 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789).

Ocena aktywności naukowej

Na całość dorobku naukowego dr. Pawła Leźnickiego składa się współautorstwo czternastu publikacji naukowych, w tym 13 artykułów w czasopismach znajdujących się w bazie JCR o sumarycznym wskaźniku wpływu IF równym 64.974. Artykuły współautorstwa Habilitanta ukazały się w prestiżowych czasopiśmie z zakresu biologii molekularnej i biochemii, takich jak *PNAS* (IF 5-letni 10.359; 1 artykuł), *Journal of Cell Science* (IF 5-letni 5.094; 7 artykułów), *Biochemical Journal* (IF 5-letni 3.850; 1 artykuł), *PLoS One* (IF 5-letni 3.352; 2 artykuły), *FEBS Letters* (IF 5-letni 3.373; 1 artykuł), *Cell Stress & Chaperones* (IF 5-letni 2.626; 1 artykuł). Jedna publikacja przeglądowa w języku polskim ukazała się w czasopiśmie *Postępy Biochemii* spoza listy JCR. Według bazy Web of Science liczba cytowań publikacji autorstwa dr. Pawła Leźnickiego na dzień złożenia wniosku wynosiła 327 (bez autocytowań 294), a na dzień 30.04.2019 odpowiednio 340 i 307. Indeks Hirscha publikacji Habilitanta wynosi 10.

Warto podkreślić, że wszystkie publikacje Habilitanta są często cytowane (w tym 7 publikacji po kilkadziesiąt razy).

Pierwszą publikacją w dorobku Habilitanta był artykuł przeglądowy w języku polskim opublikowany na łamach *Postępów Biochemii* (rok wyd. 2005) pt. "Agregacja a toksyczność białek z powtórzeniami polyQ"; warto podkreślić, że Habilitant jest jedynym autorem tej publikacji i w czasie jej pisania był jeszcze studentem. Kolejna praca współautorstwa Habilitanta (Nowicki i wsp., 2012, *Cell Stress Chaperones*; udział habilitanta 25%) dotyczyła badań nad wpływem chlorowodoru guanidyny na aktywność białek opiekuńczych Hsp100, bakteryjnego ClpB i drożdżowego Hsp104, które Habilitant prowadził podczas studiów magisterskich w laboratorium prof. Krzysztofa Liberka.

Następnie w ramach studiów doktoranckich na University of Manchester oraz staży podoktorskich dr Paweł Leźnicki uczestniczył w pracach badawczych mających na celu wyjaśnienie molekularnych mechanizmów post-translacyjnego kierowania nowo syntetyzowanych błonowych białek typu "tail-anchored" do błony retikulum endoplazmatycznego w komórkach ssaków. Efektem tych badań była identyfikacja białek ułatwiających kierowania białek z jednym regionem transbłonowym do błony retikulum endoplazmatycznego, takich jak białka opiekuńcze Hsc70 i Hsp40 (Abell i wsp., 2007, *J Cell Sci*; udział habilitanta 5%) oraz białko Bat3 (BAG6) (Leźnicki i wsp., 2010, *J Cell Sci*; udział habilitanta 80%), które w toku dalszych badań okazało się być częścią kompleksu BAG6 (BAG6-TRC35-UBL4A), który ułatwia interakcję białek typu TA z cytosolowym receptorem TRC40. Ponadto Habilitant miał też swój udział w odkryciu, że kalmodulina hamuje proces insercji białek TA do retikulum endoplazmatycznego (Hassdenteufel i wsp., 2011, *FEBS Lett*; udział habilitanta 5%) oraz że receptor TRC40 bierze udział w kierowaniu krótkich białek sekrecyjnych do translokonu Sec61w błonie ER (Johnson i wsp., 2012, *J Cell Sci*; udział habilitanta 5%). Bardzo interesujące wyniki przedstawiono w pracy Leźnicki i wsp. (2011, *Biochem J*; udział habilitanta 85%), które dostarczyły argumentów na poparcie hipotezy, że insercja białek TA do błony ER odbywa się prawdopodobnie na zasadzie spontanicznej dyfuzji hydrofobowego regionu białka do dwuwarstwy lipidowej bez udziału translokonu, a rolą interakcji cytosolowego receptora TRC40 z receptorem WRB-CAML w błonie ER jest zlokalizowanie białka TA blisko błony ER. Dwie kolejne prace w dorobku Habilitanta dotyczą drugiego wątku badań powiązanego z osiągnięciem habilitacyjnym i poświęcone są roli białka SGTA w kontroli jakości białek TA nie dostarczonych do błony ER (Wunderley i wsp., 2014, *J Cell Sci*; udział habilitanta 25%) oraz pogłębionej strukturalnej analizie interakcji SGTA z kompleksem BAG6 (Darby i wsp., 2014, *PLoS One*; udział habilitanta 5%).

Istotną częścią aktywności naukowej jest pozyskiwanie środków na badania oraz czynny udział w konferencjach naukowych i prezentowanie wyników własnych badań,

zwłaszcza w formie referatów. Dr Paweł Leźnicki wygłosił cztery referaty, w tym dwa na macierzystych uczelniach oraz podczas EMBO Practical Course: Ubiquitin and SUMO (Alghero, Włochy) i North of England Cell Biology Meeting (York, Wielka Brytania), gdzie został uhonorowany drugą nagrodą za najlepszą prezentację. Ponadto dr Leźnicki był głównym wykonawcą w jednym grantie Wellcome Trust w latach 2011-2013, a obecnie jest wykonawcą i kierownikiem w dwóch kolejnych projektach badawczych. Przy tej okazji warto wspomnieć o innych osiągnięciach Habilitanta, to jest o wyróżnieniu Jego pracy doktorskiej oraz prestiżowym stypendium Prezesa Rady Ministrów za wybitne osiągnięcia naukowe, pobieranym w latach 2005-2006 podczas studiów magisterskich Habilitanta.

Podsumowując, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny artykułów współautorstwa Habilitanta, wartości bibliometryczne oraz nowe dane, które istotnie poszerzyły wiedzę o biogenezie i kontroli jakości białek kierowanych post-translacyjnie do retikulum endoplazmatycznego oraz wyznaczyły nowe kierunki badań w tej dziedzinie, uważam, że osiągnięcia naukowo-badawcze dr. Pawła Leźnickiego spełniają ustawowe wymogi stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk biologicznych.

Ocena dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego oraz współpracy międzynarodowej

Dr Paweł Leźnicki jest współautorem kilku wielośrodkowych prac, w tym w ramach współpracy międzynarodowej między grupą prof. S. High'a (University of Manchester) a zespołem prof. R. Zimmermann'a z Medical Biochemistry and Molecular Biology (Saarland University). Dr Paweł Leźnicki odbył dwa krótkoterminowe staże naukowe na Texas A&M University w USA oraz University of Kuopio w Finlandii. W swoim dorobku Habilitant ma również wykonanie kilku recenzji prac dla prestiżowych czasopism, takich jak EMBO Journal, Nature Communications czy Journal of Cell Science, co świadczy, że dr Paweł Leźnicki jest cenionym ekspertem w swojej dziedzinie. Habilitant zrecenzował także jeden projekt badawczy dla American Institute for Cancer Research. Dr Leźnicki brał aktywny udział w wielu międzynarodowych konferencjach naukowych, głównie organizowanych przez EMBO. Ponadto dr Paweł Leźnicki jest członkiem Biochemical Society. Na uwagę zasługuje kierowanie przez Habilitanta projektem "Deciphering the molecular function of USP35" na University of Dundee we współpracy z firmą farmaceutyczną Boehringer Ingelheim. Ze względu na zajmowane stanowiska pracy o charakterze czysto naukowym (pozycje typu "post-doc") dr Paweł Leźnicki ma skromne osiągnięcia i doświadczenie w pracy dydaktycznej, obejmujące prowadzenie seminariów dla studentów biologii drugiego stopnia na University of Manchester, sprawowanie opieki naukowej nad dwoma studentami biologii

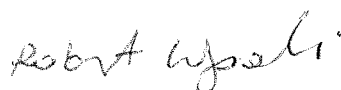
i jednym doktorantem oraz pomoc w prowadzeniu ćwiczeń laboratoryjnych dla studentów. Dr Paweł Leźnicki nie posiada innych istotnych osiągnięć na polu organizacyjnym czy popularyzacji nauki.

Podsumowując tę część oceny uważam, że dr Paweł Leźnicki spełnia w wystarczającym stopniu ustawowe kryteria w zakresie współpracy międzynarodowej, działalności organizacyjnej i dydaktycznej, aby ubiegać się o nadanie stopnia doktora habilitowanego nauk biologicznych.

Wniosek końcowy

Na podstawie przedstawionej powyżej oceny osiągnięcia naukowego, istotnej aktywności naukowej, współpracy międzynarodowej, dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego stwierdzam, że dr Paweł Leźnicki spełnia kryteria stawiane osobie ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego w obszarze nauk przyrodniczych określone w art. 16 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789), a także w rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 września 2011 r. w sprawie kryteriów oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego (Dz. U. nr 196 poz. 1165).

Popieram wniosek do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o nadanie dr. Pawłowi Leźnickiemu stopnia naukowego doktora habilitowanego nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.



Prof. dr hab. Robert Wysocki

